

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Shuji MIYAGAWA, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: MODIFIED CRE RECOMBINASE GENE FOR MAMMALS

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	11-264364	September 17, 1999

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland
Registration Number 21,124

JC916 U.S. PTO
09/662128
09/14/00
#2
11-28-00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JC916 U.S. PTO
09/662128



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 9月17日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第264364号

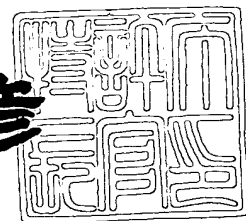
出 願 人
Applicant(s):

大阪大学長

2000年 4月21日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3028250

【書類名】 特許願

【整理番号】 A009904308

【提出日】 平成11年 9月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 15/33

【発明の名称】 哺乳類型C r e リコンビナーゼ遺伝子

【請求項の数】 20

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県芦屋市清水町 1 0 - 6

 【氏名】 宮川 周士

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6 - 3 9 - 1 0

 【氏名】 岡部 勝

【特許出願人】

 【識別番号】 391016945

 【氏名又は名称】 大阪大学長

【代理人】

 【識別番号】 100058479

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鈴江 武彦

 【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

 【識別番号】 100084618

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

 【識別番号】 100068814

 【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100092196

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 良郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100088683

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 誠

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9110282

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 Creリコンビナーゼを発現させるべき哺乳類の中で使用頻度の高いコドンを選択することにより、前記哺乳類の中で高い発現効率を有するように改変された哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子。

【請求項 2】 哺乳類の中で高い発現効率を有するように改変された配列番号 1 の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を含むポリヌクレオチド。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドであって、さらに、
(1)前記哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子に作用可能なように連結された調節配列、

(2)マーカー遺伝子、

(3)核移行シグナルをコードする核酸、

(4)Kozak配列

のうちの少なくとも 1 つを含むポリヌクレオチド。

【請求項 5】 前記調節配列のうち少なくとも 1 つが誘導性プロモーターである請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチド。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 6 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを動物個体、臓器、組織、又は細胞に遺伝子導入するためのベクター。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを遺伝子導入した動物個体。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを遺伝子導入した臓器。

【請求項 1 0】 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを遺伝子導入した組織。

【請求項 1 1】 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを遺伝子導入した細胞。

【請求項 1 2】 部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子をノックインする方法であって、

(1) 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドと、前記所望の遺伝子をノックインすべき部位特異的に及び／又は時期特異的に前記ポリヌクレオチドの発現を誘導する誘導性プロモーターとを有する第一の遺伝子構築物と、

第一の loxP 配列及び該第一の loxP 配列の下流に配置された第二の loxP 配列と、前記第一の loxP 配列の上流に配置された第二のプロモーター配列と、前記第二の loxP 配列の下流に配置された前記所望の遺伝子とを有する第二の遺伝子構築物とを

細胞、組織、臓器、又は個体に導入するステップと、

(2) 前記誘導性プロモーターの作用により部位特異的及び／又は時期特異的に Cre リコンビナーゼを発現させるステップと、

(3) 発現した Cre リコンビナーゼの触媒作用により前記第二の遺伝子構築物に部位特異的組換えを行って、前記第二の遺伝子構築物中の前記プロモーター配列を前記所望の遺伝子に作用させることにより、部位特異的及び／又は時期特異的に前記所望の遺伝子をノックインするステップと、
を具備する方法。

【請求項 1 3】 部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子をノックアウトする方法であって、

(1) 請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドと、前記所望の遺伝子をノックアウトすべき部位特異的に及び／又は時期特異的に前記ポリヌクレオチドの発現を誘導する誘導性プロモーターを有する第一の遺伝子構築物と、

第一の loxP 配列及び該第一の loxP 配列の下流に配置された第二の loxP 配列と、前記第一の loxP 配列の上流又は下流に配置されたプロモーター配列と、該プロモーター配列及び前記第一の loxP 配列の下流に配置された所望の遺伝子とを有する第二の遺伝子構築物とを、

細胞、組織、臓器、又は個体に導入するステップと、

(2)前記誘導性プロモーターの作用により部位特異的及び／又は時期特異的にCreリコンビナーゼを発現させるステップと、

(3)発現したCreリコンビナーゼの触媒作用により前記第二の遺伝子構築物に部位特異的組換えを行って、部位特異的及び／又は時期特異的に前記所望の遺伝子の全部又は一部をロックアウトするステップと、
を具備する方法。

【請求項 1 4】 前記所望の遺伝子が、異種移植抗原、癌抗原、抗抗体産生関連分子抗体の遺伝子からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 1 5】 請求項 1 2 の方法によって部位特異的及び／又は時期特異的に第一の所望の遺伝子がロックインされ、及び／又は請求項 1 3 若しくは 1 4 の方法によって部位特異的及び／又は時期特異的に第二の所望の遺伝子がロックアウトされたトランスジェニック生物。

【請求項 1 6】 前記生物がブタである請求項 1 5 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 1 7】 請求項 1 5 又は 1 6 に記載のトランスジェニック生物から取得した臓器。

【請求項 1 8】 請求項 1 5 又は 1 6 に記載のトランスジェニック生物から取得した組織。

【請求項 1 9】 請求項 1 5 又は 1 6 に記載のトランスジェニック生物から取得した細胞。

【請求項 2 0】 臓器、組織、及び／又は細胞の機能不全を病因とする疾病を治療するための方法であって、請求項 1 7 に記載の臓器、請求項 1 8 に記載の組織、及び／又は請求項 1 9 に記載の細胞をヒト以外の生物に移植することを具備する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、部位特異的組換えを触媒するリコンビナーゼの遺伝子に関する。より詳細には、哺乳類の細胞、組織、臓器、及び体内で効率よく発現し得るように

改変された哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子（配列番号 1）に関する。

【0002】

さらに、本発明は、該遺伝子を用いて部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子をノックインする方法、並びに該遺伝子を用いて部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子をノックアウトする方法にも関する。

【0003】

【従来の技術】

部位特異的組換えは、 λ ファージが宿主の染色体に自己のDNAを組み込む過程として見出された現象であり、相対的に短い特異的配列を認識して組換えを触媒する組換え酵素（以下リコンビナーゼと称する）によって行われる点で、長い相同的な核酸の対合を介して進行する相同的組換えとは根本的に異なるものである。

【0004】

部位特異的組換えを用いれば、所望の遺伝子を連結した遺伝子構築物のみを特異的に組換えて所望の遺伝子をノックインさせたり、逆に所望の遺伝子のみをノックアウトさせることによってその発現を停止させたりすることが可能である。このため、部位特異的組換えは、とりわけ発生工学の分野において、時期特異的、部位特異的に、特定の遺伝子をノックアウト又はノックインする技術として用いられている。

【0005】

以下、図 1 を参照しながら、部位特異的組換えのメカニズムとその応用について略述する。

【0006】

図 1 に示されているように、部位特異的組換えは、一対のDNAの対合から開始される相同的組換えとは異なり、DNA 2 中の特異的配列 3 にリコンビナーゼ 1 が結合し、DNA-タンパク質複合体 5 を形成することによって開始される。DNA 2 に結合したリコンビナーゼ 1 は、該DNAと同一のDNA又は異なるDNA中に存在し、特異的配列 3 と同一の塩基配列を有する特異的配列 4 を認識して該配列に結合する。なお、図 1 は、同一のDNA中に特異的配列 3 と特異的配列 4 が存在するケース

を示している。特異的配列 3 及び特異的配列 4 に結合したリコンビナーゼは、特異的配列 3 及び特異的配列 4 の 3' 末端を順次切断した後、特異的配列 3 の切断部分を A' に結合させ、特異的配列 4 の切断部分を A に結合させるという 2 回の一本鎖 DNA 切断再結合反応を触媒する。

【 0 0 0 7 】

図 1 のように特異的配列が同一の DNA 中に存在するときには、部位特異的組換えが起きると、DNA が二つに切断されるので、直鎖 DNA と環状 DNA がそれぞれ 1 個ずつ生じ、環状 DNA は元の DNA から脱落することになる。

【 0 0 0 8 】

従って、環状 DNA として脱落する部分に所望の遺伝子が配置された遺伝子構築物とリコンビナーゼ遺伝子とを染色体中に導入して、時期特異的に、及び/又は細胞・組織・臓器特異的にリコンビナーゼを発現させれば、所望の遺伝子だけを時期特異的に、及び/又は細胞・組織・臓器特異的にノックアウトさせることが可能となる。

【 0 0 0 9 】

また、第二の特異的配列の上流にプロモーターを配置し、且つ第一の特異的配列の下流に所望の遺伝子を配置した遺伝子構築物とリコンビナーゼ遺伝子とを染色体中に導入して、時期特異的に、及び/又は部位特異的にリコンビナーゼを発現させれば、部位特異的組換えによって前記所望の遺伝子が前記プロモーターの直ぐ下流に位置するように配置されるので、所望の遺伝子だけを時期特異的に、及び/又は部位特異的にノックインすることができる。

【 0 0 1 0 】

部位特異的組換えを触媒するリコンビナーゼには、酵母由来の R リコンビナーゼ及び FLP リコンビナーゼ、ファージ由来の Cre リコンビナーゼが見出されているが、酵母由来の FLP/FRT 系は、哺乳類の細胞では上手く機能しない。

【 0 0 1 1 】

これに対して、Cre リコンビナーゼと Cre リコンビナーゼが特異的に認識する loxP 配列との組み合わせからなる Cre-loxP 系は、哺乳類の細胞にも適用し得るので、哺乳類に部位特異的組換えを起こさせるために利用できる。

【0012】

しかしながら、Creリコンビナーゼは、バクテリオファージ由来のタンパク質であるため、その遺伝子のコドンは、哺乳類の細胞内での翻訳効率が低く、Creリコンビナーゼの発現量が十分ではないという欠点を有している。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ファージ由来のCreリコンビナーゼ遺伝子に存する上記欠点を克服するためになされたものであり、ファージ由来のCreリコンビナーゼ遺伝子に比べて、哺乳類の細胞、組織、臓器、又は体内での発現効率が数倍増加するように改変された哺乳類型リコンビナーゼ遺伝子を提供することを目的とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明は、哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子（配列番号1）を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明は、配列番号1の塩基配列を有する哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を提供する。

【0016】

本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子は、配列番号2のアミノ酸配列を有するバクテリアファージP1由来のCreリコンビナーゼと同一のタンパク質をコードしている。しかし、そのコドンは全て、ヒトのcDNAで最も利用頻度の高いコドンに改変されている。従って、本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼは、ファージ由来のCreリコンビナーゼ遺伝子に比べて哺乳類での発現効率が低い。

【0017】

具体的には、使用したコドンは以下のとおりである（括弧内は、バクテリオファージP1で最も使用頻度が高いコドンを示している）。

【0018】

Ala:GCC(GCT),Arg:CGC(CGC),Asn:AAC(AAT),Asp:GAC(GAT),Cys:TGC(TGT),

Gln:CAG(CAG),Glu:GAG(GAA),Gly:GGC(GGT),His:CAC(CAT),Ile:ATC(ATT),
Leu:CTG(CTG),Lys:AAG(AAA),Pro:CCC(CCT),Phe:TTC(TTT),Ser:AGC(TCA),
Thr:ACC(ACA),Tyr:TAC(TAT),Val:GTG(GTT)

なお、MetとTrpは、1種類のコドンのみによってコードされているので改変されていない。

【0019】

ヒト以外の哺乳類、例えばブタ及びマウスのcDNAで最も多用されているコドンは、Argを除いて上記各コドンと同じである。それ故、本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子は、他の哺乳類にも適用できる。他の哺乳類に適用する場合には、ヒトと使用頻度が異なるコドンがあれば、そのコドンは改変することが好ましい。例えば、Argのコドンについては、ブタではCGGからCGCに、マウスではAGAに改変することが好ましい。

【0020】

ブタとマウス以外でも、cDNAにおける各コドンの使用頻度は明らかとなっている哺乳類が多数存在するので、かかるデータに基けば最も適切なコドンを選択することが可能である。

【0021】

また、哺乳類間では各コドンの使用頻度は大きくは異ならないので、各コドンの使用頻度が不明な哺乳類に対しても、本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼを適用することが可能である。前述のように、ヒト、ブタ及びマウス間で最も使用頻度の高いコドンが異なるのは、Argのコドンだけであるが、Argには6種類のコドンが存在し、それぞれのコドンの使用頻度の差が小さいので、6種類のコドンのうち何れが最も使用頻度の高いコドンか不明であっても大きな問題は生じない。

【0022】

従って、本発明には、配列番号1のポリヌクレオチドのみならず、ヒト以外の各種哺乳類への使用に適するように若干の改変を加えたポリヌクレオチドも含まれることに留意しなければならない。

【0023】

なお、必要とする発現効率の増加量によっては、ポリヌクレオチド中のコドン全てを哺乳類に適したコドンに置き換える必要はないが、通常は全てを置換することが好ましい。

【 0 0 2 4 】

このように、本明細書において「哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子」とは、ファージ由来のCreリコンビナーゼ遺伝子に比べて、哺乳類の体内又は生体組織内での発現効率が上昇しているために、哺乳類への使用に適したCreリコンビナーゼ遺伝子を意味する。

【 0 0 2 5 】

より具体的には、本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子は、バクテリオファージP1のCreリコンビナーゼ遺伝子に比べて、少なくとも2〜3倍、一般的には数倍も上昇した発現効率を有する。

【 0 0 2 6 】

本発明は、前記哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子に調節配列、マーカー遺伝子、核移行シグナル、又はKozak配列が連結されたポリヌクレオチドも提供する。

【 0 0 2 7 】

ここで「調節配列」とは、遺伝子転写効率の増減に働くDNA上の配列を意味し、プロモーター、エンハンサー、上流活性化配列、サイレンサー、上流抑制配列、及びアテニュエーター等が含まれるが、これらに限定されない。これらの調節配列を哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子に連結するときには、作用可能なように連結することが必要である。

【 0 0 2 8 】

哺乳類型Creリコンビナーゼに連結すべき好ましい調節配列は、プロモーターであり、とりわけ誘導性プロモーターが好ましい。誘導性プロモーターは、栄養素、ホルモン、基質、温度、電磁波、酸化的ストレス等種々の物質ないし刺激によって遺伝子の発現を誘導するものが多数知られているので、当業者であれば適切な誘導性プロモーターを選択することは極めて容易である。

【 0 0 2 9 】

誘導性プロモーターを連結させる場合には、哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を発現させたい部位及び/又は時期に特異的に存在する物質によって誘導されるプロモーターを用いることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

「マーカー遺伝子」とは、哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子が標的に導入され、発現されたことの目印として機能する遺伝子であり、薬剤耐性遺伝子、発光タンパク質の遺伝子等を利用することができるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 1 】

「核移行シグナルをコードする核酸」とは、核移行シグナル（核局在シグナルとも称する）、すなわちリボソームで合成された核タンパク質を核内に輸送せしめるシグナルとして働くアミノ酸配列をコードする核酸を意味する。発現されたCreリコンビナーゼを核内に局在化させたい場合には、哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子に、核移行シグナルをコードする核酸を連結しなければならない。

【 0 0 3 2 】

「Kozak配列」とは、翻訳開始点ATGのすぐ上流（-6～-1位）のコンセンサス配列である。-6から+4までの配列で最も多い組み合わせは、GCCG/ACCATGG/Aであり、Kozak配列を保存すれば、哺乳類では翻訳効率が高くなる可能性がある。

【 0 0 3 3 】

本発明は、哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、及び調節配列、マーカー遺伝子等を連結したポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも提供する。

【 0 0 3 4 】

上述のポリヌクレオチドを個体、臓器、組織、又は細胞に導入するためのベクター、及び上述のポリヌクレオチドを導入した個体、臓器、組織、又は細胞も本発明の範囲に属する。個体、臓器、組織、又は細胞中にポリヌクレオチドを導入する方法としては、電気穿孔法、リピッド法、マイクロインジェクション法などの当業者に周知の方法を使用し得るが、これらに限定されない。

【 0 0 3 5 】

哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を導入すべき哺乳動物は任意の生物であり得る。哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を導入すべき臓器には、肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓、小腸等の消化管が含まれるがこれらに限定されない。哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を導入すべき組織には、脳組織、皮膚、皮下組織、上皮組織、骨、筋等の組織が含まれるがこれらに限定されない。哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を導入すべき細胞には、上記の臓器又は組織を構成する全ての細胞、特に肝細胞、脾細胞に加えて、卵細胞、受精卵、及び胚性幹細胞が含まれるがこれらに限定されない。

【0036】

本発明は、Creリコンビナーゼによって触媒される部位特異的組換え反応を利用して、部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子をロックインする方法も提供する。

【0037】

該方法では、哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子に誘導性プロモーターを連結した第一の遺伝子構築物によって、二つのloxP配列、ロックインすべき所望の遺伝子、及びプロモーターを具備する第二の遺伝子構築物に部位特異的組換え反応を起こさせる。

【0038】

第一の遺伝子構築物に連結する誘導性プロモーターは、所望の遺伝子をロックインすべき部位及び／又は時期特異的に哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子の発現を誘導し得るものを選択する。従って、第二の遺伝子構築物の部位特異的組換え反応は、所望の部位及び／又は時期特異的に起こることになる。

【0039】

第二の遺伝子構築物の中に存在するプロモーターは、図2に示されているように、二つのloxP配列のうち上流側に存在する第一のloxP配列の上流に配置されている。該プロモーターは、ロックインされた所望の遺伝子が発現を誘導し得るように、すなわち所望の遺伝子に作用可能なように配置しなければならない。

【0040】

所望の遺伝子は、第二のloxP配列の下流に配置されているので、Creリコンビ

ナーゼがloxP配列を特異的に認識して部位特異的組換えが起こると、第一のloxP配列と第二のloxP配列の間に介在している塩基配列が脱落し、所望の遺伝子が第一のloxP配列と結合する。

【 0 0 4 1 】

バクテリオファージP1に由来する野生型のloxP配列は、塩基配列ATAACTTCGTA TAGCATACATTATACGAAGTTATを有するが、人為的に該配列を一部欠損させたloxP66(TTCGTATAGCATAGATTATACGAAGTTAT)、及びloxP71(ATAACTTCGTATAGCATACATT ATACGA A)のようなloxP配列を用いてもよい。従って、本明細書において「loxP配列」には、野生型のloxP配列及び該配列と同等の機能を有する改変loxP配列も含まれる。

【 0 0 4 2 】

第一のloxPには、直接又は近傍にプロモーターが連結されているので、部位特異的組換えによって第一のloxP配列と結合した所望の遺伝子は、該プロモーターの作用で発現を開始することになる。

【 0 0 4 3 】

従って、第一の遺伝子構築物と第二の遺伝子構築物を所望の生体組織（すなわち、個体から取り出した臓器、組織、若しくは細胞）又は個体に導入すれば、所望の部位及び/又は時期に所望の遺伝子の発現を開始させることができる。

【 0 0 4 4 】

第一及び第二の遺伝子構築物を導入すべき生体組織又は個体は、任意のものであり得るが、哺乳類型Creリコンビナーゼを遺伝子導入するのに適した生体組織又は哺乳類として、本明細書で前述したものに導入するのが好ましい。

【 0 0 4 5 】

該方法によって所望の遺伝子を部位特異的及び/又は時期特異的にロックインされたトランスジェニック動物、及び該動物から取得した臓器、組織、又は細胞も本発明の範囲に属する。

【 0 0 4 6 】

さらに、同様に部位特異的組換えを利用して、部位特異的及び/又は時期特異的に所望の遺伝子をロックアウトさせる方法も本発明の範囲に属する。

【0047】

所望の遺伝子をノックアウトする方法は、所望の遺伝子をノックインする方法と同じく部位特異的組換えによって達成される。本方法の操作は、基本的には、所望の遺伝子をノックインする方法と同じであるが、第二の構築物中のプロモーター配列と所望の遺伝子の配置が異なる。

【0048】

本方法の概略及び典型的な第二の構築物の構造は、図3に示されているとおりである。

【0049】

もっとも、本方法は所望の遺伝子の発現を停止させることを目的とするので、特異的組換えによって、プロモーター配列と所望の遺伝子の全部又は一部何れか一方、又は両者が第二の遺伝子構築物からノックアウトされればよい。従って、第二の構築物中の、loxP配列、プロモーター配列、所望の遺伝子の配置には、以下の三種類の配置：

- ①～「プロモーター」－「loxP」－「所望の遺伝子」－「loxP」～
- ②～「loxP」－「プロモーター」－「所望の遺伝子」－「loxP」～
- ③～「loxP」－「プロモーター」－「loxP」－「所望の遺伝子」～、

が考えられる。なお、実際にノックアウトする場合には、所望の遺伝子の1乃至複数のエクソンをノックアウトすることの方が通常なので、「所望の遺伝子」には、遺伝子全体及び遺伝子の一部の両者が含まれる。

【0050】

従って、本明細書において「所望の遺伝子をノックアウトする」とは、所望の遺伝子それ自体を直接ノックアウトすることは勿論、1乃至複数のエクソンのみをノックアウトすることにより、又はプロモーターをノックアウトすることにより、その発現を停止させることをも含むことに留意しなければならない。

【0051】

1乃至複数のエクソンのみをノックアウトする場合には、ノックアウトすべきタンパク質の活性を停止又は減少させるようにエクソンを選択する。

【0052】

本発明の方法においては、典型的には、所望の遺伝子が二つの loxP 配列の間に存在しているために、部位特異的及び／又は時期特異的に部位特異的組換えが起これば、所望の遺伝子は、第二の遺伝子構築物からノックアウトされる。従って、本発明の方法を用いれば、部位特異的及び／又は時期特異的に、特定の遺伝子の発現を停止させることが可能となる。

【 0 0 5 3 】

本発明の方法によりノックアウトすべき遺伝子は、任意の遺伝子であり得るので、本発明の方法は、基礎及び臨床医学を含む極めて広範な範囲に応用することができる。

【 0 0 5 4 】

該方法によって、部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子がノックアウトされたトランスジェニック動物、及び該動物から取得した臓器、組織、又は細胞も本発明の範囲に属する。

【 0 0 5 5 】

これら二つの方法によって、第一の所望の遺伝子を部位特異的及び／又は時期特異的にノックインし、第二の所望の遺伝子を部位特異的及び／又は時期特異的にノックアウトさせることも勿論可能であり、このような方法、このような方法によって作出されたトランスジェニック動物、該動物から取得した臓器、組織、又は細胞も本発明の範囲に属する。

【 0 0 5 6 】

本発明の方法の第一の応用例として、臓器特異的に異種移植抗原をノックアウトした臓器移植用のトランスジェニックブタを作出することを挙げることができる。異種移植においては、異種移植抗原の存在によって激しい拒絶反応が起こるので、異種移植抗原がノックアウトされた動物を用いれば、拒絶反応を回避することが可能となる。

【 0 0 5 7 】

しかしながら、従来のように全身の異種移植抗原をノックアウトすると、該抗原の欠損によってブタに様々な疾病や障害が起こるという問題点が生じる。

【 0 0 5 8 】

これに対して、本発明の方法により、臓器特異的に異種移植抗原がノックアウトされたトランスジェニックブタでは、必要最小限の臓器のみで異種移植抗原がノックアウトされているにすぎないので、抗原の欠損による疾病や障害を停止又は抑制できる。

【0059】

ブタの場合には、 $\alpha 1,3$ -ガラクトシルトランスフェラーゼの α Galエпитープが最大の異種移植抗原なので該抗原がノックアウトされたトランスジェニックブタは、特に好ましい。

【0060】

なお、本明細書において「異種移植抗原」とは、異種移植片に対するレシピエントの拒絶反応の原因となる異種移植片上の抗原物質を意味する。

【0061】

第二に、本発明の方法は細胞移植に応用できる。ウイルス、例えばSV40由来の癌抗原遺伝子を二つのloxPで挟んだ遺伝子構築物を移植細胞に導入すれば不死化した細胞に無限増殖を開始させることができる。その後、一定量に達した後に、Creリコンビナーゼを発現させれば、癌抗原遺伝子が除去されて、増殖が停止し、続いてこの移植細胞をレシピエントに移植すればよい。

【0062】

移植細胞としては、肝細胞及び脾細胞を挙げることができるが、これに限定されない。

【0063】

第三に、本発明の方法は、抗抗体産生関連分子抗体を部位特異的及び／又は時期特異的にノックアウトさせるために利用できる。

【0064】

ここで、「抗抗体産生関連分子抗体」とは、抗体産生機構に直接又は間接的に関与する分子に対する抗体を意味し、CD3、CD4、CD28、CTLA4、CD80、T細胞受容体、主要組織適合抗原、IL-4、IL-5、IL-6等のサイトカイン、及びサイトカイン受容体等が含まれるがこれらに限定されない。

【0065】

抗抗体産生関連分子抗体は、移植に伴う免疫反応を抑制し得るので、ウイルスベクターにこれらの分子の遺伝子を組み込んで遺伝子導入すれば、拒絶反応が大幅に抑制される。

【 0 0 6 6 】

しかし、免疫抑制状態は移植初期にしか必要なく、引き続き免疫系を抑制すれば、重篤な免疫不全症が発症する危険性が極めて高い。それ故、本発明の方法によって、移植初期に限って免疫抑制状態にすれば、臓器移植の成功率を著しく挙げることになる。

【 0 0 6 7 】

以上、とりわけ有用な応用例である移植を例に挙げて、本発明の方法の応用例を具体的に示したが、これらは例示であって、いかなる意味においても本発明の範囲を限定するものではない。従って、特定の遺伝子を部位特異的及び／又は時期特異的にノックイン又はノックアウトされた疾患モデル動物の作成、遺伝子治療等本発明の他の応用例、それらによって得られる動物及び生体組織も本発明の範囲に含まれることは、当業者であれば自明であろう。

【 0 0 6 8 】

以下、実施例によって、本発明をさらに詳細に説明する。

【 0 0 6 9 】

【実施例】

〔実施例 1〕

本実施例では、以下のコドン：Ala:GCC, Arg:CGC, Asn:AAC, Asp:GAC, Cys:TGC, Gln:CAG, Glu:GAG, Gly:GGC, His:CAC, Ile:ATC, Leu:CTG, Lys:AAG, Pro:CC C, Phe:TTC, Ser:AGC, Thr:ACC, Tyr:TAC, Trp:TGG, Val:GTGを含有する哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子のcDNAに、核移行シグナルProLysLysLysArgLysValをコードする核酸配列CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGを連結したCreリコンビナーゼcDNA構築物を合成して、従来のCreリコンビナーゼ遺伝子とmRNA及びタンパクの発現量を比較した。

【 0 0 7 0 】

該cDNAを構築物を発現ベクターpCAGGSに組み込み、電気刺激によってCHO細胞

にトランスフェクションして一過性の発現の差異を調べた。結果を図4に示す。

【0071】

図4の上段はウェスタンブロッティング、下段はノーザンブロッティングを示している。

【0072】

ウェスタンブロッティングから明らかなように、従来のCre(wt-Cre)は2日目でピークに達し、4日目には発現がなくなったのに対し、哺乳類型Cre(s-Cre)は、3日目まで増産され、5日目も発現をみた。3日目における哺乳類型Creのタンパク量は、従来のCreの約7倍にも及んだ。

【0073】

また、ノーザンブロッティングは、mRNAの発現量は両者とも3日目で終わりを示すが、2日目、3日目における哺乳類型CreタンパクのmRNA量は、それぞれ4.2倍、6.6倍に達していた。

【0074】

なお、GAPDHは、ゲルに流したmRNA量の指標である。

【0075】

【実施例2】

本実施例では、二つのloxP配列とCAGプロモーターを含む遺伝子構築物pCXN-YK1(図5)を用いて、哺乳類型Creリコンビナーゼと従来のCreリコンビナーゼのcDNAが組換えを引き起こす頻度の差について調べた。

【0076】

まず、pCXN-YK1を構築してCHO細胞にトランスフェクトし、安定な細胞株を作った(クローン29とクローン30)。

【0077】

次に、図6に示した量の従来のCreと哺乳類型CreのcDNAを、それぞれ発現ベクターpCXNとpMC1に組み込んで、電気刺激によって、該cDNAをクローン29とクローン30にトランスフェクトして、Cre-loxP系による組換えがおこる差異を調べた。pCXNはCAGのプロモーターとサイトメガロウイルスのエンハンサーを含む発現ベクターであり、pMC1はチミジンキナーゼプロモーターとポリオーマのエンハンサー

ーを含む発現ベクターである。

【0078】

図6から明らかなように、pMC1-Cre/クローン29（パネルC）とpMC1-Cre/クローン30（パネルD）では、5、20、及び50 μ gのDNA量にわたって、哺乳類型CreのcDNAは、従来のCreのcDNAに比べて、有意に高い組換え頻度を示した（T検定）。

【0079】

pCXN-Cre/クローン29（パネルA）では5 μ gと20 μ gのDNA量で、pCXN-Cre/クローン30（パネルB）では20 μ gのDNA量で、哺乳類型CreのcDNAが有意に高い組換え頻度を示した。

【0080】

本実施例により、哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子が、従来のCreリコンビナーゼ遺伝子に比べて、実際に高い頻度で組換えを引き起こすことが実証された。

【0081】

【発明の効果】

本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子は、ウイルス由来の野生型Creリコンビナーゼ遺伝子に比べて、哺乳類の体内、臓器、組織、又は細胞内での発現量が数倍も高いという顕著な効果を有する。このように、哺乳類でのCreリコンビナーゼの発現量が高いので、哺乳類の中での部位特異的組換え頻度が有意に高くなる。

【0082】

本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を用いれば、所望の遺伝子を部位特異的及び／又は時期特異的にノックイン、又はノックアウトすることが可能となる。

【0083】

このような方法を用いれば、部位特異的及び／又は時期特異的に特定の遺伝子をノックイン、又はノックアウトしたトランスジェニック動物、臓器、組織、又は細胞を作出することができるので、臓器移植、遺伝子治療、疾患モデル動物の作出等の臨床医学及び基礎科学に計り知れない有用性をもたらす。

【0084】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka University

<120> Mammalian Type Cre Recombinase Gene

<130> Cre recombinase gene

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1050

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1050)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:gene

<400> 1

atg ccc aag aag aag agg aag gtg agc aac ctg ctg acc gtg cac cag	48
Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln	
aac ctg ccc gcc ctg ccc gtg gac gcc acc agc gac gag gtg cgc aag	96
Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys	
20 25 30	
aac ctg atg gac atg ttc cgc gac cgc cag gcc ttc agc gag cac acc	144
Asn Leu Met Asp Met Phe Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr	
35 40 45	
tgg aag atg ctg ctg agc gtg tgc cgc agc tgg gcc gcc tgg tgc aag	192
Trp Lys Met Leu Leu Ser Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys	
50 55 60	
ctg aac aac cgc aag tgg ttc ccc gcc gag ccc gag gac gtg cgc gac	240
Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp	
65 70 75 80	
tac ctg ctg tac ctg cag gcc cgc ggc ctg gcc gtg aag acc atc cag	288
Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln	
85 90 95	
cag cac ctg ggc cag ctg aac atg ctg cac cgc cgc agc ggc ctg ccc	336
Gln His Leu Gly Gln Leu Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro	
100 105 110	
cgc ccc agc gac agc aac gcc gtg agc ctg gtg atg cgc cgc atc cgc	384
Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg	

特平 1 1 - 2 6 4 3 6 4

115	120	125	
aag gag aac gtg gac gcc ggc gag cgc gcc aag cag gcc ctg gcc ttc			432
Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe			
130	135	140	
gag cgc acc gac ttc gac cag gtg cgc agc ctg atg gag aac agc gac			480
Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp			
145	150	155	160
cgc tgc cag gac atc cgc aac ctg gcc ttc ctg ggc atc gcc tac aac			528
Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn			
165	170	175	
acc ctg ctg cgc atc gcc gag atc gcc cgc atc cgc gtg aag gac atc			576
Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile			
180	185	190	
agc cgc acc gac ggc ggc cgc atg ctg atc cac atc ggc cgc acc aag			624
Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys			
195	200	205	
acc ctg gtg agc acc gcc ggc gtg gag aag gcc ctg agc ctg ggc gtg			672
Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val			
210	215	220	
acc aag ctg gtg gag cgc tgg atc agc gtg agc ggc gtg gcc gac gac			720
Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp			
225	230	235	240

ccc aac aac tac ctg ttc tgc cgc gtg cgc aag aac ggc gtg gcc gcc	768
Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala	
245 250 255	
ccc agc gcc acc agc cag ctg agc acc cgg gcc ctg gag ggc atc ttc	816
Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe	
260 265 270	
gag gcc acc cac cgc ctg atc tac ggc gcc aag gac gac agc ggc cag	864
Glu Ala Thr His Arg Leu Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln	
275 280 285	
cgc tac ctg gcc tgg agc ggc cac agc gcc cgc gtg ggc gcc gcc cgc	912
Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg	
290 295 300	
gac atg gcc cgc gcc ggc gtg agc atc ccc gag atc atg cag gcc ggc	960
Asp Met Ala Arg Ala Gly Val Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly	
305 310 315 320	
ggc tgg acc aac gtg aac atc gtg atg aac tac atc cgc aac ctg gac	1008
Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp	
325 330 335	
agc gag acc ggc gcc atg gtg cgc ctg ctg gag gac ggc gac	1050
Ser Glu Thr Gly Ala Met Val Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp	
340 345 350	

<210> 2

<211> 350

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Met Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser Asn Leu Leu Thr Val His Gln
1 5 10 15

Asn Leu Pro Ala Leu Pro Val Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg Lys
20 25 30

Asn Leu Met Asp Met Phe Arg Asp Arg Gln Ala Phe Ser Glu His Thr
35 40 45

Trp Lys Met Leu Leu Ser Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys Lys
50 55 60

Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg Asp
65 70 75 80

Tyr Leu Leu Tyr Leu Gln Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile Gln
85 90 95

Gln His Leu Gly Gln Leu Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu Pro
100 105 110

Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile Arg
115 120 125

Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly Glu Arg Ala Lys Gln Ala Leu Ala Phe

130

135

140

Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser Asp

145

150

155

160

Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Asn

165

170

175

Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp Ile

180

185

190

Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr Lys

195

200

205

Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly Val

210

215

220

Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp Asp

225

230

235

240

Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys Arg Val Arg Lys Asn Gly Val Ala Ala

245

250

255

Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu Ser Thr Arg Ala Leu Glu Gly Ile Phe

260

265

270

Glu Ala Thr His Arg Leu Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly Gln

275	280	285
Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala Arg		
290	295	300
Asp Met Ala Arg Ala Gly Val Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala Gly		
305	310	315
Gly Trp Thr Asn Val Asn Ile Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asp		
325	330	335
Ser Glu Thr Gly Ala Met Val Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp		
340	345	350

【図面の簡単な説明】

【図 1】

部位特異的組換えのメカニズムを示す図。

【図 2】

本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を用いて、部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子をノックインする方法を示す図。

【図 3】

本発明の哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を用いて、部位特異的及び／又は時期特異的に所望の遺伝子をノックアウトする方法を示す図。

【図 4】

本発明の哺乳類型CreリコンビナーゼのcDNAとウイルス由来のCreリコンビナーゼのcDNAの転写効率及び翻訳効率の比較を行った実施例 2 の結果を示す図。

【図 5】

実施例 2 に用いた遺伝子構築物の模式図。

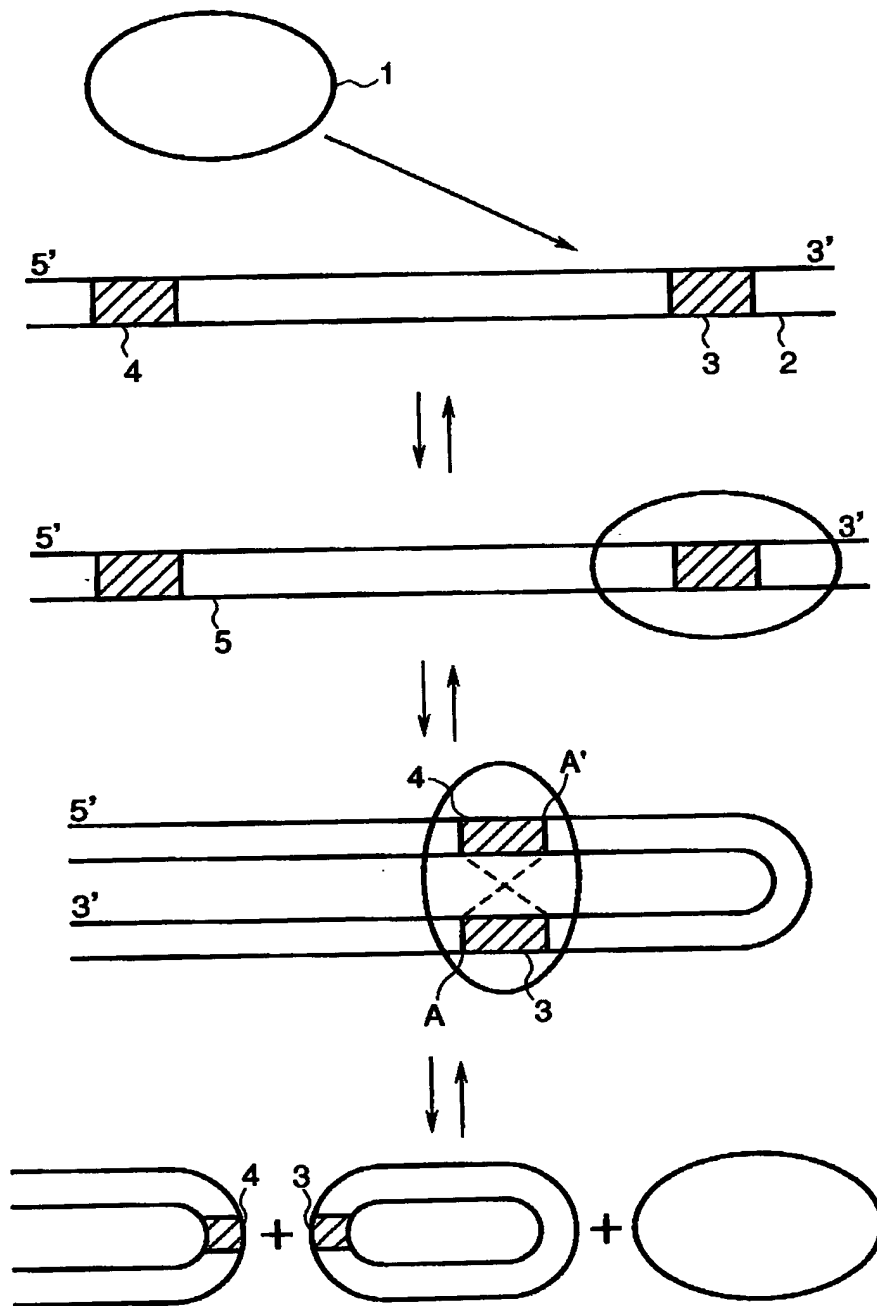
【図 6】

哺乳類型Cre-lox系と従来のCre-loxP系における組換え頻度の差を示す図。

【書類名】

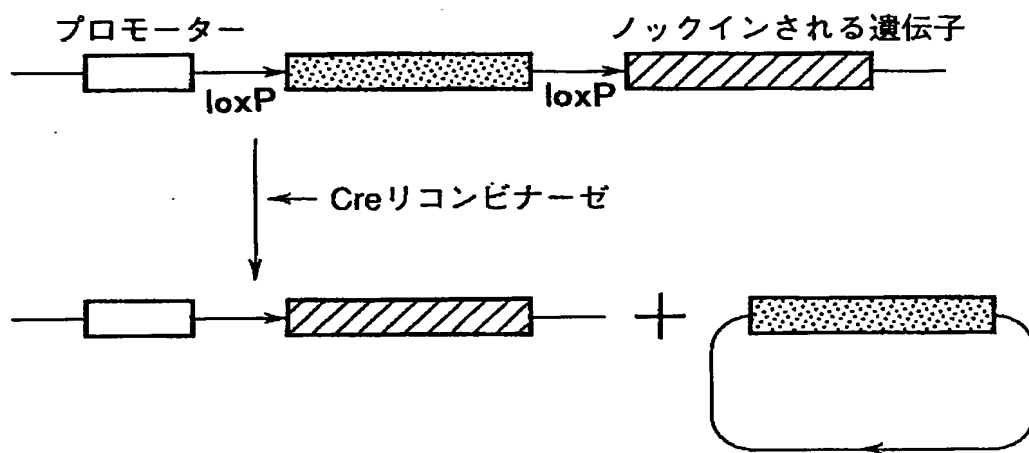
図面

【図 1】

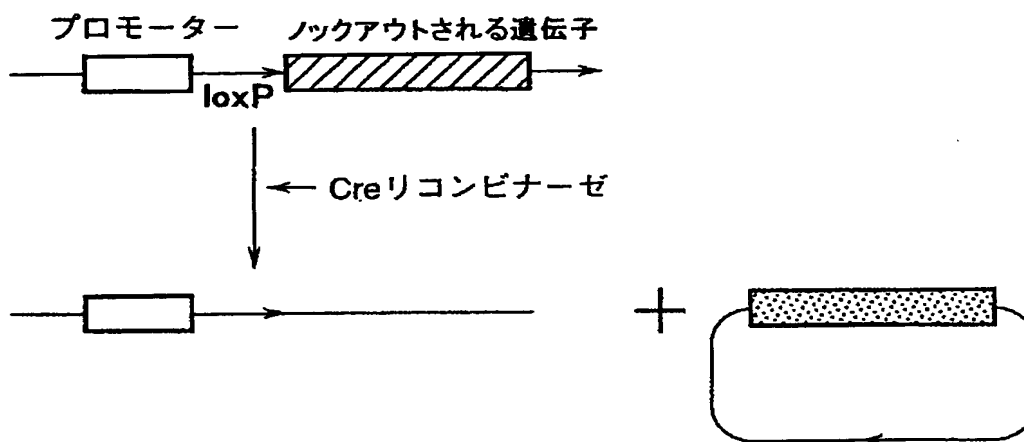


1: リコンビナーゼ
 2: DNA
 3: 特異的配列I
 4: 特異的配列II
 5: DNA-タンパク質複合体

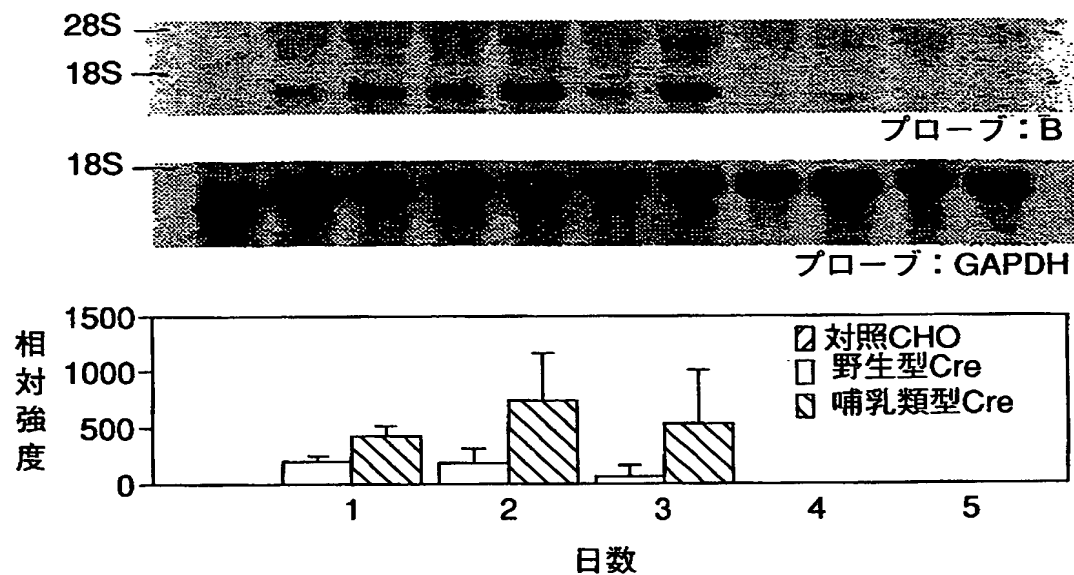
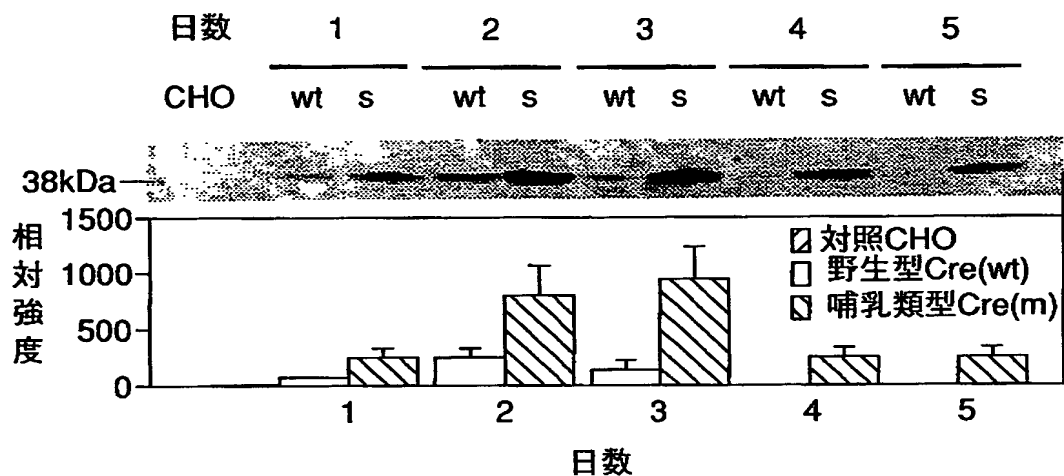
【図 2】



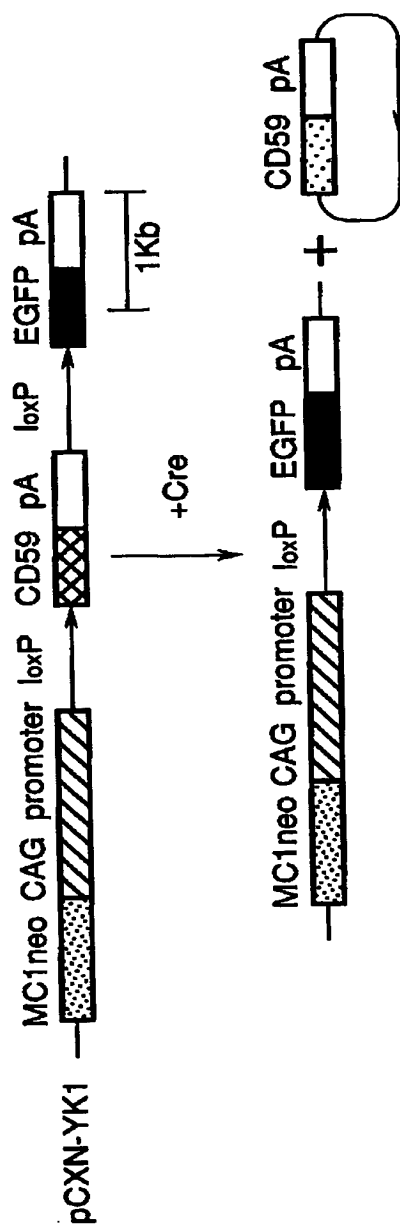
【図 3】



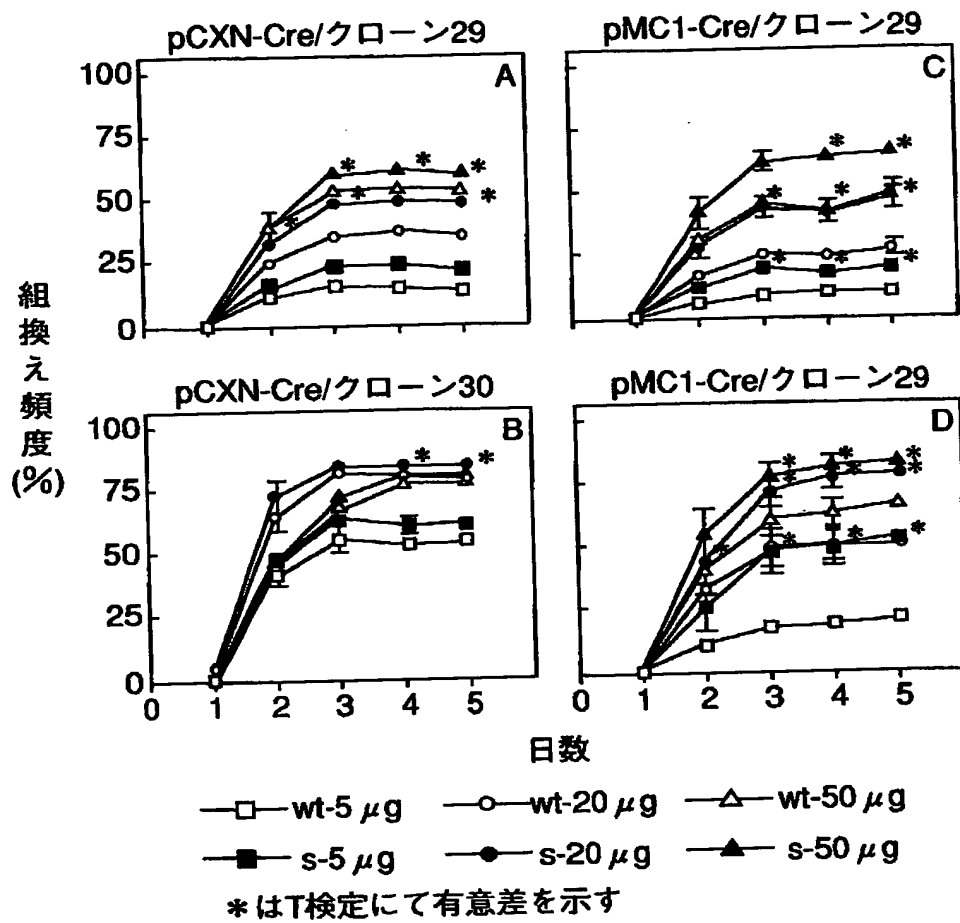
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、ファージ由来のCreリコンビナーゼ遺伝子に比べて、哺乳類の細胞、組織、臓器、又は体内での発現効率が数倍増加するように改変された哺乳類型リコンビナーゼ遺伝子を提供することを目的とする。

【解決手段】 この課題を解決するために、本発明は、哺乳類の細胞で利用頻度の高いコドンからなる哺乳類型Creリコンビナーゼ遺伝子を提供する。

【選択図】 なし

特平 11-264364

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[391016945]

1. 変更年月日	1991年 1月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府吹田市山田丘1番1号
氏 名	大阪大学長